

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
Katedra experimentální biologie rostlin

Sekretorická dráha rostlin v obraně před patogeny

Bakalářská práce

Peter Sabol
Školitel: Mgr. Ivan Kulich
Praha 2010

Pod'akovanie

Ďakujem školiteľovi Mgr. Ivanovi Kulichovi za pomoc a čas, ktorý mi pri konzultáciách nad touto bakalárskou prácou venoval a tiež za trpezlivosť, ktorú niekedy pri mne potreboval. Za cenné pripomienky k textu ďakujem osobitne RNDr. Viktorovi Žárskému, CSc. a za rady k písaniu tiež Doc. RNDr. Fatime Cvrčkovej, Dr.rer.nat.

Obsah

Zoznam skratiek.....	2
Abstract (in English)	3
Abstrakt.....	4
Úvod.....	5
1 Rastlina a patogén.....	6
1.1 Obranná odpoveď rastliny.....	6
1.1.1 Nehostiteľská odolnosť.....	6
1.1.1.1 Hypersenzitívna reakcia.....	7
1.1.1.2 Typy nehostiteľskej odolnosti.....	8
1.1.2 Hostiteľská odolnosť.....	10
1.1.2.1 Proteíny kódované R génmi.....	10
1.1.2.2 Model strážcu (The Guard Model).....	11
1.1.2.3 "The Decoy Model".....	12
1.1.3 RIN4 ako príklad koevolúcie patogéna a hostiteľa.....	14
2 Rastlina a polarizovaná sekrécia.....	16
2.1 Bunková polarita u rastlín.....	16
2.1.1 Bunková polarita a exocytóza.....	16
2.1.1.1 Exocyst a polarizovaná sekrécia.....	17
2.1.1.2 Indukcia Exo70 podjednotiek exocystu patogénmi a elicitorami.....	18
3 Polarizovaná sekrécia a patogén.....	21
3.1 Sekrécia ako obrana.....	21
3.1.1 Úloha sekrécie pri tvorbe papily a haustoriálnych obalov pri ataku hubového patogéna.....	21
3.1.1.1 Reorganizácia cytoskeletu v procese polarizovanej sekrécie pri útoku patogéna	22
3.1.1.2 SNARE proteíny a obrana založená na papile.....	22
3.1.2 Sekrécia v obrane proti bakteriálnym patogénom.....	26
3.1.2.1 SYP132 syntaxín a obrana proti <i>Pseudomonas syringae</i>	26
3.1.2.2 Fúzia vakuoly s CPM sprostredkovaná proteazómom.....	27
4 Záver.....	29
5 Zoznam použitej literatúry.....	31

Zoznam skratiek

ACD	<i>activated cortical domain</i>
Avr	avirulentný proteín
Bgh	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
BS	bunková stena
CPM	cytoplazmatická membrána
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
GEFs	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GTPáza	guanozíntrifosfatáza
HR	<i>hypersensitive response</i>
LRR	<i>leucine-rich repeats</i>
MVB	<i>multivesicular body</i>
NBS	<i>nucleotide binding site</i>
PAMPs	<i>pathogenity associated molecular patterns</i>
PMB	<i>paramural body</i>
PR	<i>pathogenesis-related</i> (proteins)
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
<i>Pstab</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
RD	<i>recycling domain</i>
RIN4	<i>RPM1 interacting protein 4</i>
RLKs	<i>receptor-like serine/threonine kinases</i>
RNAi	RNA interferencia
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SNAP	<i>synaptosomal-associated protein</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
tabak	<i>Nicotiana benthamiana</i>
TEM	transmisná elektrónová mikroskopia
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
WT	<i>wild type</i>

Abstract

Plants are sessile organisms that have to cope with the changes of their ambient environment. These changes include abiotic disturbances and stresses as well as biotic interactions with other organisms. In many of the biotic interactions, plant cells are hurt or damaged by various bacterial and fungal pathogens. Moreover, plants lack mobile immune cells, which would otherwise render them susceptible to most of these pathogens. Plants have, however, developed other mechanisms for suppressing the infection. Activating the components of the secretory pathway during resistance response is crucial step for suppressing the penetration and growth of pathogens.

Fungal pathogens, such as powdery mildews, usually attempt to penetrate the cell wall in order to gain the access to protoplast providing nutrients and to exchange their virulence factors. On the other hand, pathogenic bacteria inhabit extracellular spaces of plant tissues. In both cases, however, the deposition of papilla into the plant cell wall was observed. Papilla thus seems to be the common defence mechanism. There is an increasing evidence confirming the indispensable role of polarized secretion in formation of papilla.

Recently, SNARE proteins participating in papilla-associated defence have been described. PEN1 and SNAP33 syntaxins are of particular interest. Accumulation of these proteins in the interior of papilla was confirmed by using the combination of transmission electron and fluorescence microscopy techniques. Interestingly, it is suggested that the accumulation of PEN1 and SNAP33 proteins in papilla occurs by the mechanism of exosome biogenesis and release.

Secretion of antimicrobial compounds is another important mechanism in resistance against bacterial pathogens. SYP132 syntaxin directly participates in this process by mediating the fusion of exocytotic vesicles carrying pathogenesis-related (PR) proteins with the plasma membrane. PR proteins subsequently restrict the growth and multiplication of extracellular pathogenic bacteria.

Recently, a novel mechanism involving the fusion of the large central vacuole with the plasma membrane following the release of antimicrobial proteins and hypersensitive cell death has been described. Proteasome seems to directly regulate this process probably by degrading the negative regulator of the fusion.

An octameric exocyst complex mediates the vesicle tethering during exocytosis in plants. To date it is not known whether this complex also enables polarized secretion of cargo to the site of infection or papilla formation. A large number of Exo70 subunit copies along with the accessible microarray data suggest that exocyst could be involved in polarized secretion during pathogen attack.

Keywords: pathogen, resistance response, polarized secretion, exocyst, papilla, SNARE

Abstrakt

Rastliny sú sesilné organizmy a preto sa musia vysporiadať so zmenami v ich bezprostrednom okolí. Medzi takéto zmeny patria rôzne abiotické stresy a disturbancie, ale aj biotické interakcie s inými organizmami. Mnohé biotické interakcie zahŕňujú poškodzovanie rastlinných buniek hubovým alebo bakteriálnym patogénom. Rastliny navyše nemajú mobilné bunky imunitného systému. Napriek tomu si vyvinuli iné mechanizmy na potlačenie infekcie. Aktivovanie komponentov sekretorickej dráhy pri napadnutí patogénom predstavuje kľúčový krok obrannej odpovede.

Hubové patogény, ako napr. skupina *powdery mildews*, obvykle penetrujú bunkovú stenu rastlinnej bunky a tak získavajú prístup k živinám poskytovaným protoplastom a zároveň dodávajú virulentné faktory. Patogénne baktérie sa naopak množia v extracelulárnych priestoroch. V oboch prípadoch však bola pozorovaná spoločná odpoveď, a to tvorba obrannej papily.

V nedávnej dobe boli opísané SNARE proteíny zúčastňujúce sa na obrannej odpovedi súvisiacej s tvorbou papily. Konkrétny záujem je venovaný PEN1 a SNAP33 syntaxínom cytoplazmatickej membrány. Akumulácia týchto proteínov v papile bola potvrdená na základe pozorovaní pomocou transmisnej elektrónovej a fluorescenčnej mikroskopie. Zároveň bol navrhnutý mechanizmus akumulácie PEN1 a SNAP33 syntaxínov v papile prostredníctvom tvorby a uvoľňovania exozómov.

Sekrécia antimikrobiálnych zlúčenín je ďalším dôležitým mechanizmom uplatňujúcim sa pri obrane proti patogénnym baktériám. SYP132 syntaxín sa priamo zúčastňuje na tomto procese tým, že sprostredkúva fúziu váčkov s PR (*pathogenesis-related*) proteínmi s cytoplazmatickou membránou. PR proteíny následne zamedzujú rast a množenie extracelulárnych patogénnych baktérií.

Relatívne nedávno bol opísaný proces fúzie veľkej centrálnej vakuoly s cytoplazmatickou membránou za súčasného uvoľnenia antimikrobiálnych zlúčenín do apoplastu a následnej indukcie hypersenzitívnej reakcie. Je pozoruhodné, že významnú úlohu v tomto procese zohráva proteazóm, ktorý reguluje splývanie pravdepodobne degradovaním negatívneho regulátora fúzie.

Oktamérny komplex exocyst sa podieľa na procese *tetheringu* vezikulu v priebehu exocytózy. Aj keď v súčasnosti nie je známe či a akým mechanizmom sa exocyst podieľa na polarizovanej sekrécii do miesta ataku a tvorby papily, veľký počet Exo70 podjednotiek naznačuje, že exocyst by mohol byť účastný polarizovanej sekrécie pri útoku patogéna.

Kľúčové slová: patogén, obranná odpoveď, polarizovaná sekrécia, exocyst, papila, SNARE

Úvod

Rastlina je v priebehu svojho životného cyklu vystavená celej škále biotických a abiotických faktorov prostredia. Medzi biotické faktory spadajú interakcie s inými organizmami v prostredí. Interakcie môžu byť buď vzájomne prospešné, alebo pre jednu zo zúčastnených strán nevýhodné. V prípade, že je v nevýhode rastlina, môže ísť o poškodzovanie rastlín patogénmi, inými rastlinami alebo herbivornými živočíchmi.

Interakcia rastlina-patogén je príkladom zaujímavého biologického fenoménu obrannej odpovede rastlín. Napadnutie patogénom a následná obranná odpoveď rastliny je preto v súčasnosti jednou z intenzívne študovaných tém rastlinnej molekulárnej biológie a fytopatológie.

V prvej kapitole sú preto vysvetlené niektoré základné pojmy a princípy týkajúce sa interakcie rastliny a patogéna. Druhá kapitola v prehľade popisuje uplatnenie a stručný mechanizmus polarizovanej exocytózy v procesoch sekrécie. Načrtnutý je tiež význam relatívne novo objaveného komplexu exocyst a jeho funkcie v rastlinnej bunke.

Tretia kapitola sa snaží integrovať poznatky z prvých dvoch kapitol a aplikovať ich na konkrétne situácie obrannej reakcie.

Exocytóza je dôležitý mechanizmus uplatňujúci sa v procesoch ontogenézy, ale aj pri obrane proti patogénom. V súčasnosti prebieha pomerne intenzívny výskum zaoberajúci sa prevažne terminálnymi krokmi procesu exocytózy v odpovedi na útok patogéna. SNARE proteínom je preto venovaná značná časť tejto bakalárskej práce. Pri opise je tiež zdôraznený význam jednotlivých metodických prístupov, ktoré pomohli odhaliť mnohé mechanizmy uplatňujúce sa pri sekretorickej obrane.

1 Rastlina a patogén

1.1 Obranná odpoveď rastliny

Rastlina reaguje na útok patogéna obrannou odpoveďou (en: *resistance response*). Prirodzenú ochranu pred patogénmi, ale aj inými vonkajšími faktormi, tvoria krycie pletivá a sekundárne metabolity (napr. C. Kwon, P. Bednarek, P. Schulze-Lefert, 2008). Kritickým krokom interakcie rastliny s patogénom je vzájomné rozpoznávanie. Keď rastlina rozpozná prítomnosť patogéna, zahájí obrannú reakciu. Na základe rozpoznania patogéna rastlinnou bunkou rozlišujeme 2 typy obrannej odpovede rastlín (M. Odjakova, Ch. Hadjiivanova, 2001) :

- Nehostiteľská (*nonhost resistance*) odolnosť
- Hostiteľská odolnosť (*host alebo race/cultivar specific resistance*)

1.1.1 Nehostiteľská odolnosť

Rezistencia, v ktorej celý rastlinný druh je odolný voči všetkým genotypom daného druhu patogéna sa nazýva nehostiteľská odolnosť (napr. W. Underwood, S. C. Somerville, 2008). Obrana spočíva v mechanizmoch, ktoré zahŕňajú konštitutívne bariéry a indukovateľné reakcie (T. Nürnberger, V. Lipka, 2005). Medzi konštitutívne bariéry patria už spomínané sekundárne metabolity a bunkové steny. Táto línia obrany má za úlohu zabrániť prístupu patogéna k samotnému protoplastu rastlinnej bunky. Akonáhle sa patogénovi podarí prekonať tieto konštitutívne mechanizmy a príde do styku s cytoplazmatickou membránou (CPM) protoplastu, bunka rozpozná patogéna a zahájí indukovanú reakciu. Bunka rozpozná prítomnosť patogéna na základe tzv. exogénnych a endogénnych elicitorov, ktoré sa viažu na špecifické receptory na CPM.

Medzi exogénne elicitory patria tzv. PAMPs - molekulárne vzory asociované s patogenitou (*pathogenity associated molecular patterns*). Patria medzi ne molekuly odvodené od patogéna a sú často spoločné celej skupine patogénov, preto ich bunka dokáže ľahko rozpoznať. Medzi PAMPs patria napr. lipopolysacharidy bunkovej steny Gram negatívnych baktérií, flagelín z bakteriálneho bičíka, chitín z bunkovej steny húb, enzým invertáza kvasiniek a iné (T. Nürnberger, V. Lipka, 2005). Rozpoznanie PAMPs nie je výlučnou vlastnosťou rastlín, ale vyskytuje sa aj u živočíchov, kde je dobre charakterizované.

Endogénne elicitory sú molekuly uvoľnené z bunkovej steny rastlinnej bunky vznikajúce pri pokuse patogéna prelomiť konštitutívnu bariéru. Uvoľňujú sa pôsobením rôznych hydrolytických enzýmov patogéna štiepiacich polysacharidové zložky rastlinnej bunkovej steny. Štiepením

pektínov vznikajú kratšie galakturonany nazývané oligosacharíny (R. Ovidio *et. al.*, 2004).

Indukovaná obranná odpoveď sa začína naviazaním elicitorov na ich receptory. Aktivuje sa signálna kaskáda, ktorá zahŕňa zvýšenie cytoplazmatickej koncentrácie Ca^{2+} a aktiváciu MAP kináz, zmenu koncentrácie NO a reaktívnych foriem kyslíka (ROS = *reactive oxygen species*) (T. Nürnberger, V. Lipka, 2005). MAP kinázy aktivované touto signálnou dráhou sa pravdepodobne premiestňujú do jadra, kde umožňujú transkripciu PR (*pathogenesis related*) génov (T. Nürnberger, V. Lipka, 2005). Produkty týchto génov sú často enzýmy, ktoré narušujú bunkovú stenu a CPM patogéna, pôsobia ako RNAázy, alebo blokujú enzýmy produkované patogénom (M. Odjakova, Ch. Hadjiivanova, 2001). Ďalšou odpoveďou je produkcia fytoalexínov. Sú to nízkomolekulárne antimikrobiálne zlúčeniny, ktoré sa syntetizujú až po indukciu elicitorom (K. S. Mysore, Choong-Min Ryu, 2004). Narozdiel od nich sú fytoanticipíny inhibičné zlúčeniny prítomné už pred útokom patogéna, čo napovedá aj ich názov (M. Naoumkina *et. al.*, 2007). Dôležitú úlohu v indukovanej odpovedi zohráva aj polarizovaná sekrécia v mieste ataku patogéna. Dochádza pri nej k depozícii fenolických látok a antimikrobiálnych zlúčenín do tzv. paramurálneho priestoru medzi CPM a bunkovú stenu za súčasnej syntézy kalózy čím vzniká útvar nazývaný obranná papila (C. Kwon, P. Bednarek, P. Schulze-Lefert, 2008).

Prehľad udalostí vedúcich k tvorbe obrannej odpovede je znázornený na Obr. 1.

1.1.1.1 Hypersenzitívna reakcia

V súvislosti s nehostiteľskou odolnosťou sa uplatňuje ešte jeden dôležitý obranný mechanizmus. Je ním hypersenzitívna reakcia (HR = *hypersensitive response*). Hypersenzitívna reakcia je charakteristická rapídnu programovanou bunkovou smrťou v mieste infekcie (K. S. Mysore, Choong-Min Ryu, 2004). Výsledkom je, že patogén je obmedzený na nekrotické lézie, ktoré vznikajú po odumretí buniek (M. Odjakova, Ch. Hadjiivanova, 2001). Hypersenzitívna reakcia je charakteristická nielen pre nehostiteľskú, ale aj hostiteľskú odolnosť (*host defence/resistance*) (M. C. Whalen, 2005; K. S. Mysore, Choong-Min Ryu, 2004).

1.1.1.2 Typy nehostiteľskej odolnosti

Na základe prítomnosti či absencie HR v obrane navrhujú autori Kirankumar S. Mysore a Choong-Min Ryu rozdeľovať nehostiteľskú odolnosť na 2 typy (Kirankumar S. Mysore, Choong-Min Ryu, 2004).

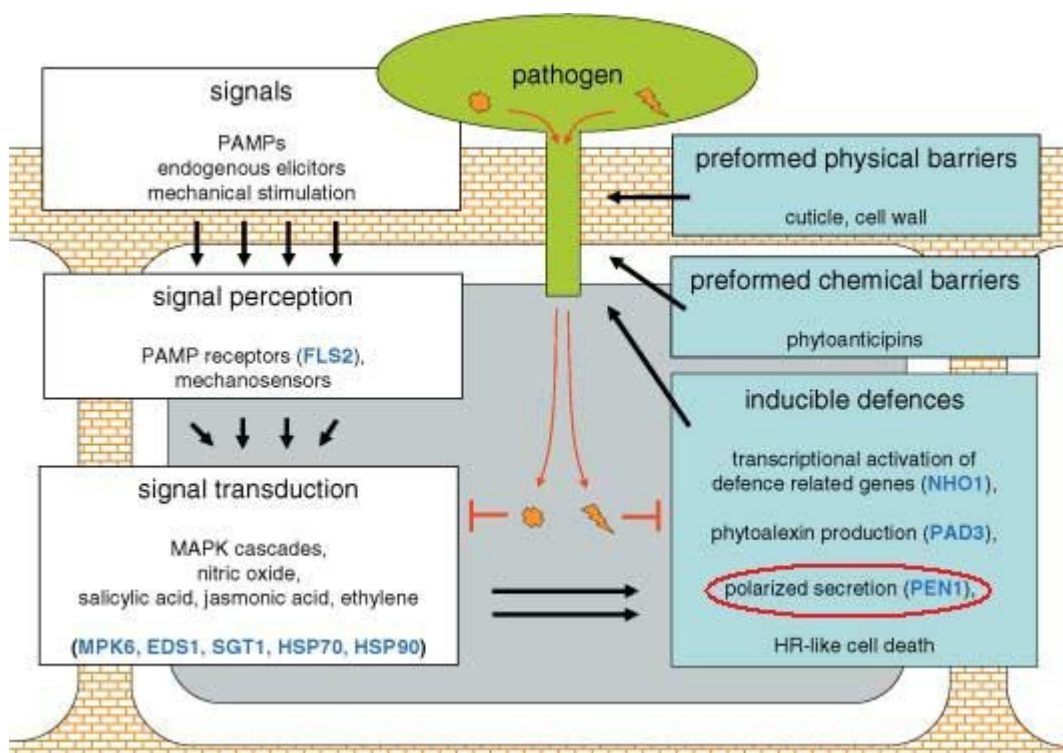
Typ I nevykazuje žiadnu viditeľnú nekrózu a teda HR. Je to pravdepodobne najčastejší typ nehostiteľskej odolnosti. Patogén v tomto prípade nedokáže prekonať buď konštitutívnu alebo indukovanú obranu bunky. Príkladom môžu byť rôzne poddruhy bakteriálneho patogéna

Pseudomonas syringae na *Arabidopsis* (Kirankumar S. Mysore, Choong-Min Ryu, 2004).

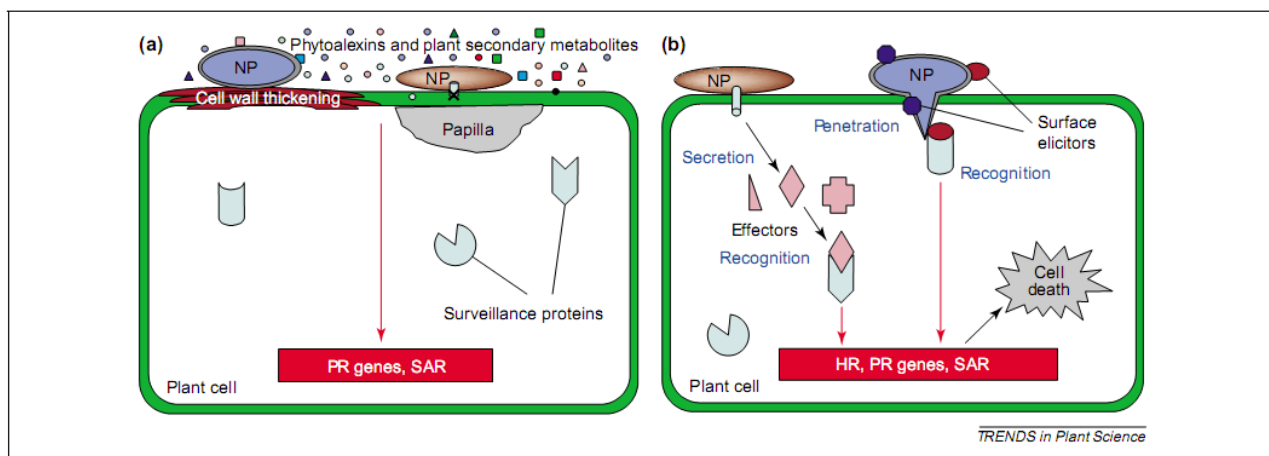
Typ II nehostiteľskej odolnosti charakterizuje prítomnosť HR. Patogény spôsobujúce tento typ odpovede prekonávajú konštitutívnu ochranu produkciou detoxifikačných enzýmov, ktoré blokujú antimikrobiálne zlúčeniny produkované rastlinnou bunkou. Nedokážu ale prekonať indukovanú odpoveď. Bunka rozpozná elicitory odvodené od takýchto patogénov, čo často vedie k HR. Elicitory, ktoré sú rozpoznávané bunkou a sú schopné navodiť obrannú odpoveď sa nazývajú avirulentné proteíny (Avr). Zatiaľ čo u húb fungujú ako elicitory povrchové štruktúry alebo sekretované proteíny, v prípade bakteriálnych patogénov dochádza k injikovaniu potencionálnych elicitorov do bunky hostiteľa (Kirankumar S. Mysore, Choong-Min Ryu, 2004).

Hypersenzitívna reakcia, produkcia ROS a ukladanie lignínu do BS v mieste ataku patogéna predstavujú v mnohých prípadoch spoločné črty obrany založenej na nehostiteľskej aj hostiteľskej odolnosti. Je možné, že nehostiteľská a hostiteľská odpoveď majú svoje oddelené signálne dráhy, ktoré sa ale občas stretávajú a neskôr môžu splývajú (Kirankumar S. Mysore, Choong-Min Ryu, 2004).

Prehľad mechanizmov zúčastňujúcich sa nehostiteľskej odolnosti I. a II. typu podľa tejto teórie je znázornený na Obr. 2.



Obrázok 1: Prehľad nehostiteľskej odolnosti. Biele rámčeky znázorňujú stimulujúce signály a ich rozpoznanie pomocou receptorov a následnú signálnu kaskádu. Mechanizmy v modrých rámčekoch sa podieľajú na konštitutívnej a indukovanej obrannej odpovedi. Patogén schopný infikovať daný druh rastliny produkuje efektorové proteíny, ktoré potlačujú odpoveď bunky na rôznych úrovniach, čo je naznačené červenými šípkami. S červeným oválom je zvýraznená úloha polarizovanej sekrécie. (Podľa T. Nürnberger, V. Lipka: Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon, 2005; Upravené)



Obrázok 2: Typy nehostiteľskej odpovede. Modro znázornené nehostiteľské patogény (NP) predstavujú huby alebo oomycéty, hnedé ovály reprezentujú bakteriálne NP. a) Typ I nehostiteľskej odolnosti zahŕňa tvorbu PR génov, vyvolanie SAR, hrubnutie BS a tvorbu obrannej papily; b) Typ II obrannej odpovede predstavuje okrem expresie PR génov a navodenia SAR aj programovanú bunkovú smrť buniek pletiva v mieste penetrácie a v jeho okolí (HR). (Podľa Kirankumar S. Mysore, Choong-Min Ryu: Nonhost resistance: how much do we know?, 2004)

1.1.2 Hostiteľská odolnosť

Mechanizmy nehostiteľskej odolnosti postačujú na obranu rastliny pred väčšinou potencionálnych patogénov (W. Underwood, S. C. Somerville, 2008). Obranná línia rastliny však napriek tomu môže byť prekonaná konkrétnymi kmeňmi alebo kultivarmi daného druhu patogéna. Takéto kmene/kultivary získali tzv. virulentné faktory, ktoré im umožnili potlačiť obrannú odpoveď rastliny (T. Nürnberger, V. Lipka, 2005). Reakciou na to bolo u rastliny vyvinutie mechanizmov založených na expresii tzv. *R* génov (T. Nürnberger, V. Lipka, 2005). Produkty *R* (*resistance*) génov sú receptory vysoko špecifické pre daný kmeň/kultivar patogéna. Tieto receptory sú schopné rozpoznať tzv. avirulentné proteíny (*Avr*) odvodené od konkrétneho patogéna (M. Odjakova, Ch. Hadjiivanova, 2001), pričom jednotlivé receptory rozoznávajú len odpovedajúce špecifické produkty *Avr* génov. (M. Odjakova, Ch. Hadjiivanova, 2001). *Avr* proteíny predstavujú časť súboru proteínov s virulentnou funkciou, ktoré sú sekretované patogénom a sú označované ako efekторы (*R*. A. L. van der Hoorn, S. Kamoun, 2008). Teória obrany založená na interakcii (priamej či nepriamej; vid' nižšie) receptoru, ktorý je kódovaný *R* génom a *Avr* proteínu kódovaného *Avr* génom sa v anglickej literatúre označuje ako *gene-for-gene-hypothesis* (T. Nürnberger, V. Lipka, 2005) a je súčasťou hostiteľskej odolnosti (M. Odjakova, Ch. Hadjiivanova, 2001). Obrana založená na interakcii *R-Avr* proteínov sa niekedy nazýva aj efektorom spustená (indukovaná) imunita (*ETI = effector-triggered immunity*), zatiaľčo rozpoznanie *PAMPs* často pozorované v prípade nehostiteľskej odolnosti býva označované ako imunita spustená (indukovaná) *PAMP* (*PTI = PAMP triggered immunity*) (S. Hou, Y. Yang, Jian-Min Zhou, 2009), prípadne všeobecne ako bazálna obrana (*basal defence*) (T. Nürnberger, V. Lipka, 2005; S. Hou, Y. Yang, Jian-Min Zhou, 2009).

Rozdelenie obrany na hostiteľskú a nehostiteľskú odolnosť je však do určitej miery umelé a *ETI* aj *PTI* imunita sa môže uplatňovať u oboch typov odpovede.

Obrannou reakciou hostiteľskej odolnosti je obyčajne (podobne ako v mnohých prípadoch nehostiteľskej odolnosti; vid' vyššie) *HR* v mieste infekcie (S. Hou, Y. Yang, Jian-Min Zhou, 2009).

1.1.2.1 Proteíny kódované *R* génmi

R génmi kódované proteíny (tzv. *R* proteíny) sa tradične rozdeľujú do piatich tried (M. Odjakova, Ch. Hadjiivanova, 2001):

1.intracelulárne proteínkinázy

2.receptorové proteínkinázy s extracelulárnou doménou bohatou na leucínové repetície (*LRR = leucine-rich repeat*)

3.intracelulárne *LRR* proteíny s väzbovým miestom pre nukleotidy (*NBS = nucleotide binding site*) a motívom leucínového zipsu (*LZ = leucine zipper*)

4.intracelulárne NBS-LRR proteíny s oblasťou podobnou s Toll a interleukínovým receptorom (TIR proteíny) u *Drosophily* a cicavcov

5.na membránu viazané extracelulárne LRR proteíny

Väčšinu R proteínov predstavujú NBS-LRR proteíny (Y. Belkadir, R. Subramaniam, J. L. Dangl, 2004).

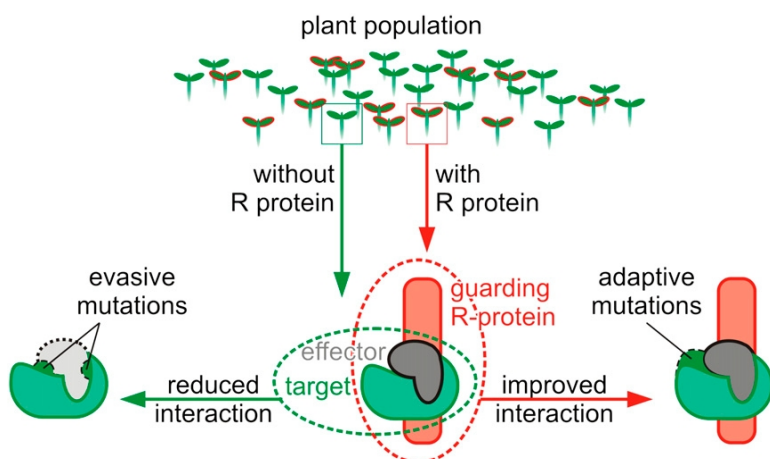
Ako môže *Arabidopsis* s takýmto relatívne malým súborom *R* génov rozpoznať veľký počet Avr proteínov u rôznych kultivaroch patogéna? Doteraz boli navrhnuté 2 modely, ktoré sa pokúšajú nájsť odpoveď na túto otázku.

1.1.2.2 Model strážcu (The Guard Model)

Hypotéza *gene-for-gene* rozpoznávania pôvodne predpokladala priamu interakciu Avr proteínu a R receptoru. Táto interakcia bola v niekoľkých prípadoch potvrdená, v množstve iných prípadov však žiadny fyzický kontakt R-Avr nebol pozorovaný. Interakcia medzi Avr proteínom a R receptorom sa preto zdá byť nepriama (R. A. L. van der Hoorn, S. Kamoun, 2008). Na základe toho bol navrhnutý tzv. *Guard Model* (voľne preložené ako model strážcu), ktorý predpokladá, že R receptor funguje ako strážca (*Guard*), ktorý neinteraguje priamo s efektorom (efektorovou molekulou), ale kontroluje a monitoruje cieľ (*target*) efektora. Ak efektor syntetizovaný patogénom pozmení svoju cieľovú molekulu (za účelom manipulovania funkcií hostiteľskej bunky), je modifikovaná cieľová molekula rozpoznaná R receptorom a zaháji sa obranná odpoveď (R. A. L. van der Hoorn, S. Kamoun, 2008). Tento model zároveň vysvetľuje nízky počet *R* génov u *Arabidopsis* nutných na monitorovanie niektorých vlastných molekúl ako potencionálnych cieľov pre efekторы patogéna. V skutočnosti boli objavené efekторы, ktoré modifikujú viacero cieľových molekúl (R. A. L. van der Hoorn, S. Kamoun, 2008).

Autori R. A. L. van der Hoorn a S. Kamoun však poukazujú na nestabilnú situáciu v populácii polymorfnej pre *R* gény (polymorfná sa tu rozumie prítomnosť či neprítomnosť funkčných *R* génov u jednotlivých rastlín). V prípade, že rastlina nemá *R* gény, dochádza k selekcii smerom k tvorbe mutácii v cieľi (*target*) pre daný efektor za účelom znížiť silu väzby medzi efektorom a jeho cieľom. Opačná situácia nastáva u jedincov, ktorí vlastnia *R* gény. V tomto prípade pôsobí selekcia na zvýšenie interakcie cieľa a efektora pre silnejšiu interakciu s R proteínom. Situáciu znázorňuje Obr. 3.

Tieto skutočnosti viedli spomínaných autorov k tvorbe tzv. *Decoy* modelu.



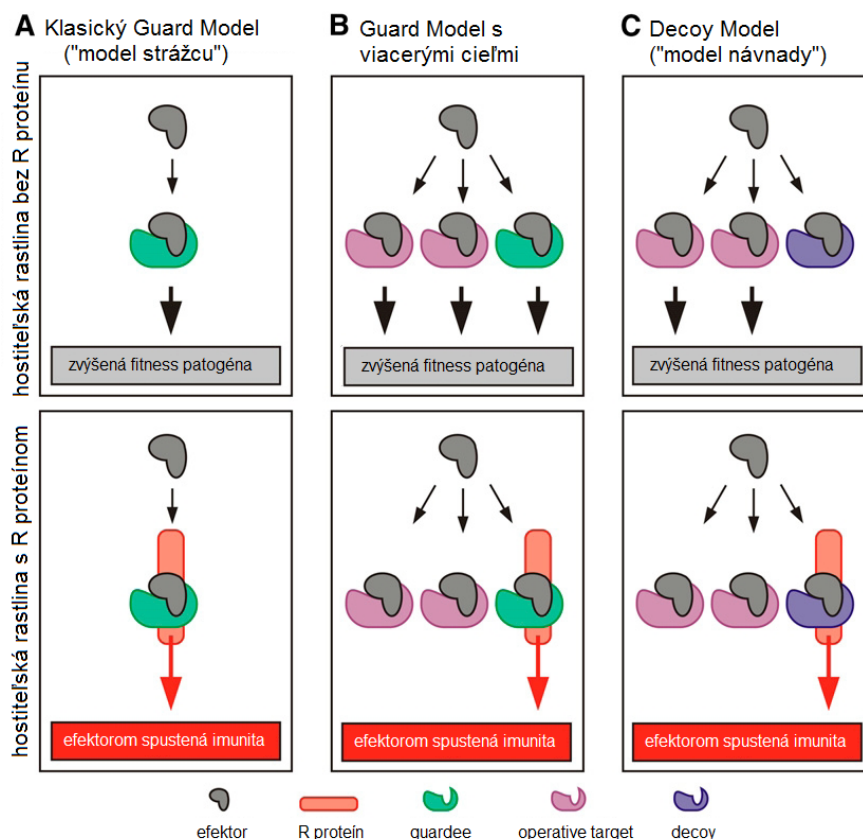
Obrázok 3: Opačný smer pôsobenia selekčných síl v populácii polymorfnej pre *R* gény. (Podľa R. A. L. van der Hoorn, S. Kamoun, 2008)

1.1.2.3 "The Decoy Model"

Riešením nestabilnej situácie pri selekcii na ciele efektorov by bola génová duplikácia, ktorá by viedla k vývoji proteínu napodobňujúceho samotný cieľ. Takýto proteín by slúžil ako návnada (anglicky: *decoy*), ktorá by síce bola atakovaná efektorom, ale v neprítomnosti *R* proteínu by nemala vplyv na virulenciu patogéna. Jej úlohou by bolo len umožniť rozpoznať prítomnosť efektorov pomocou *R* receptorov bez vplyvu na funkcie bunky pri jej pozmenení. Na základe týchto predpokladov formulovali už vyššie spomínaní autori R. A. L. van der Hoorn a S. Kamoun tzv. *Decoy Model*, čo sa dá voľne preložiť ako model návnady (príp. lákača) (R. A. L. van der Hoorn, S. Kamoun, 2008).

Aký je rozdiel medzi jednotlivými modelmi? Situáciu názorne popisuje Obr. 4. Na vysvetlenie vnímania efektorov pomocou *R* proteínov využíva klasický *Guard model* len termíny „*R* proteín“ a „cieľ“. Cieľ v tomto modeli sa označuje aj ako *guardee* (sledovaný/stráženy cieľ efektoru ;*guarded effector target*) a v neprítomnosti *R* proteínu po modifikácii efektorom patogéna prispieva k zvýšeniu fitness patogéna. V neprítomnosti *R* proteínu sa *guardee* zúčastňuje hostiteľskej obrany a preto jeho modifikácia efektorovou molekulou má za následok zníženú obranyschopnosť a tým zvýšený fitness patogéna. Ak má rastlina funkčný *R* proteín, dokáže rozpoznať pozmenený cieľ a zaháji obrannú odpoveď. V prípade modifikovaného *Guard* modelu má efektor viac cieľov, pričom niektoré z nich nie sú monitorované *R* proteínom. Tieto ciele sú tu označované ako *operative targets* a ich modifikácia pomocou efektorov pri absencii *R* proteínu zvyšuje fitness patogéna. Okrem nich v neprítomnosti *R* proteínu prispieva k zvýšenej fitness patogéna aj modifikácia klasického *guardee*. V prítomnosti *R* proteínu dôjde k rozpoznaní

pozmeneného *guardee* a spustí sa obranná odpoveď. Iná je situácia v prípade *Decoy* modelu. Pre rastlinu by totiž bolo výhodné, keby vytvorila molekulu, ktorá by svojou štruktúrou bola podobná nesledovanému operatívne cieľu (*operative target*), ale narozdiel od neho by bola v prítomnosti efektorov rozpoznávaná R proteínom. Zároveň by pri absencii R proteínu nesmela mať vplyv na fitness patogéna. V neprítomnosti R proteínu by teda narozdiel od *Guard* modelu s viacerými (sledovanými) cieľmi k zvýšenej fitness patogéna prispievali iba operatívne ciele. Takouto molekulou je *decoy* (návnada, lákač, pasca), pretože síce umožní vlastné pozmenenie pomocou efektorovej molekuly, ale neumožní to zvýšiť fitness patogéna, práve naopak, v prítomnosti R proteínu je rozpoznaná jej modifikácia a rastlina sa začne proti patogénovi aktívne brániť. Zároveň je ním vyriešená nestabilná situácia opačných selekčných tlakov na *guardee* – v prípade *decoy* je len selekčný tlak smerom k zvýšeniu interakcie s efektorovou molekulou patogéna (R. A. L. van der Hoorn, S. Kamoun, 2008).



Obrázok 4: Porovnanie modelov popisujúcich interakciu R proteínu a Avr efektora. (A) Klasický *Guard* model, (B) *Guard* model s viacerými cieľmi, (C) *Decoy* model. Pre podrobnosti pozrite text. (Podľa R. A. L. van der Hoorn, S. Kamoun, 2008; upravené)

1.1.3 RIN4 ako príklad koevolúcie patogéna a hostiteľa

Výsledok interakcie medzi bakteriálnym patogénom a hostiteľskou rastlinou závisí na schopnosti efektorových molekúl prispievať k virulencii daného patogéna a schopnosti rastliny rozpoznať prítomnosť týchto efektorov a aktívne sa brániť. V historickom kontexte tak dochádza ku koevolúcii molekúl patogéna a hostiteľa, pričom stratégie oboch strán môžu zahŕňať veľmi komplexné mechanizmy.

Príkladom interakcie molekúl patogéna a hostiteľa v koevolučnom kontexte je modifikácia RIN4 proteínu v *Arabidopsis* bakteriálnymi efektormi baktérie *Pseudomonas syringae*. RIN4 (*RPM1 interacting protein 4*) je negatívnym regulátorom PTI aj ETI obrannej odpovedi (M. G. Kim *et al.*, 2005; H. Kim *et al.*, 2005). Po injikovaní bakteriálnych efektorov do hostiteľskej bunky prostredníctvom sekrétneho systému typu III je RIN4 modifikovaný minimálne tromi efektorovými molekulami a táto modifikácia spúšťa ETI na základe rozpoznania pomocou aspoň dvoch rôznych R proteínov. RIN4 je fosforylovaný po interakcii s AvrRpm1 alebo AvrB efektormi čo spôsobuje

aktiváciu RPM1 R proteínu. Tretí efektor AvrRpt2 slúži ako cysteínová proteáza, ktorá štiepi RIN4 na dvoch konzervovaných miestach (RCS1 a RCS2) čo aktivuje RPS2 R proteín. RIN4 ako aj všetky tri efekторы a R proteíny podieľajúce sa na týchto interakciách sú rôznymi spôsobmi viazané alebo asociované s membránou (D. Mackey *et al.*, 2002; D. Mackey *et al.*, 2003; H. Kim *et al.*, 2005).

Na príklade RIN4 je vidieť možnú koevolúciu hostiteľa a patogéna. Po tom, čo sa rastlina adaptuje na rozpoznanie nového efektora syntetizovaním R proteínu rozpoznávajúceho tento efektor, patogén začne tvoriť iný typ efektora atakujúceho iný alebo ten istý cieľ v hostiteľskej bunke, na čo bunka reaguje vývojom nového R proteínu registrujúceho túto zmenu a tak ďalej.

Úloha RIN4 proteínu v obrannej odpovedi rastlín vrátane možného prepojenia so sekretorickou dráhou je v súčasnosti predmetom intenzívneho výskumu.

2 Rastlina a polarizovaná sekrécia

Táto kapitola predstavuje úvod do polarizovanej sekrécie u rastlín. V žiadnom prípade plne nepokrýva danú problematiku a slúži prevažne ako prerekvizita pre kapitolu 3.

2.1 Bunková polarita u rastlín

Jednou zo základných vlastností charakterizujúcich väčšinu buniek rastlinného tela je bunková polarita. V širšom zmysle je bunková polarita chápaná ako určitá asymetria v rámci bunky. V užšom zmysle ide o polárnu distribúciu molekúl v bunke, ktorá je zahájená polarizujúcim signálom (Z. Yang, 2008). Prejavmi bunkovej polarity je vrcholový rast bunky (anglicky *tip growth*), neizodiametrická bunková expanzia a depozícia proteínov a v neposlednom rade aj delenie bunky, teda cytokinéza (V. Žárský, F. Cvrčková, M. Potocký, M. Hála, 2009). Bunková polarita u rastlín sa uplatňuje v priebehu ontogenézy, rastu a odpovedi na rôzne vnútorné a vonkajšie podnety. (Z. Yang, 2008).

Polaritu možno pozorovať už v rannom štádiu ontogenézy, kedy dochádza k asymetrickému deleniu zygoty, ktorému predchádzalo nerovnomerné rozdelenie niektorých organel do oblastí opačných pólov bunky. V embryogenéze tiež dochádza po prvýkrát k polárnemu transportu auxínu, ktorého gradient následne umožňuje tvorbu orgánov. V bunkách rhizodermis sa zasa diferencujú koreňové vlásky, ktoré sa predlžujú jedným smerom (polarizovane). Podobným príkladom vrcholového rastu je prerastanie peľového vrecúška cez pletivá piestika smerom k vajíčku. Počas morfogénzy buniek epidermis u *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) vznikajú následkom neizodiametrickej expanzie laločnaté bunky pripomínajúce svojim vzhľadom a usporiadaním dlaždice na chodníku (anglicky sa tieto bunky označujú ako *pavement cells*). Všetky tieto procesy dokumentujú nezastupiteľnú úlohu bunkovej polarizácie vo vývine, raste a morfogénze (Z. Yang, 2008).

Na zachovaní bunkovej polarity sa podieľa vezikulárny transport a cytoskelet (Z. Yang, 2008). Ústrednú úlohu zohráva exocytóza.

2.1.1 Bunková polarita a exocytóza

Jedným z hlavných mechanizmov bunkovej morfogénzy je exocytóza (V. Žárský *et al.*, 2009). Ide o transport a splývanie sekreторických váčkov so špecifickými oblasťami CPM. Opačným smerom, t.j. smerom od bunkového povrchu do rôznych oblastí bunky, sú váčky transportované procesom nazývaným endocytóza. V skutočnosti sú exocytóza a endocytóza neoddeliteľné časti jedného dynamického sekreторického procesu, v ktorom dochádza k recyklácii časti CPM a proteínov v nej prítomných. Takáto recyklujúca oblasť CPM podliehajúca endocytóze a následne exocytóze sa

nazýva recyklujúca doména (anglicky *recycling domain*; RD). RD predstavuje dynamickú priestorovo-časovú entitu (V. Žárský *et al.*, 2009). Známym príkladom je recyklácia výtokových transportérov pre auxín nazývaných PIN.

Procesom polarizovanej exocytózy teda dochádza k smerovaniu váčkov do špecifických oblastí CPM. Tieto oblasti pripravené na alebo podliehajúce exocytóze a endocytóze sa označujú aj ako tzv. aktivované kortikálne domény (anglicky *activated cortical domain(s)*; ACD) (V. Žárský *et al.*, 2009). Ako sú ACD definované? Sú to membránové domény obohatené o steroly známe ako lipidické rafty so špecifickými proteínmi v tomto prípade charakteristickými pre ACD. Kľúčovú úlohu tu zohrávajú malé GTPázy triedy Rho, u rastlín označované ako Rop. GTPázy triedy Rop regulujú nielen samotný proces splývania váčku s CPM, ale aj pomáhajú organizovať cytoskelet pre transport týchto váčkov. Pre rôzne ACD sú ďalej charakteristické rôzne serín-treonínové receptorové kinázy (RLKs = *receptor-like serine/threonine kinases*) prijímajúce signály z apoplastu. Spolu so skupinou GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) (triedy PRONE) katalyzujúcou výmenu GDP za GTP u Rop GTPáz sa RLKs významne podieľajú na regulácii aktivity Rop GTPáz a tvorbe ACD (A. Berken *et al.*, 2005; S. Yalovsky *et al.*, 2008).

ACD ako membránový raft vykazuje špecifické zloženie fosfolipidov. Prevládajú tu rôzne formy fosfoinozítidov, ktoré sa viažu na niektoré proteínové motívy. V prípade vrcholovo rastúcich buniek sa na vrchole rastúcej časti vyskytuje fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát. Je syntetizovaný za katalýzy niekoľkých izoform fosfatidylinozitol-4-fosfát-5-kinázy. Fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát je naopak degradovaný činnosťou fosfolipázy C lokalizovanej tesne za rastúcim vrcholom peľového vrecúška (B. Kost *et al.*, 1999; B. Kost, 2008).

2.1.1.1 Exocyst a polarizovaná sekrécia

Ako bolo ukázané, v procese exocytózy dochádza k fúzii rôznych typov vezikulov s CPM a prípadne k následnému uvoľneniu vezikulárneho obsahu do apoplastu. Samotnému procesu splývania však ešte predchádzajú procesy v anglickej literatúre označované ako *tethering* (*tether* = povraz na uviazanie, uzda) a *docking*. Počas *tetheringu* je vezikul pripojený k membráne vo vzdialenosti väčšej ako polovica jeho priemeru, zatiaľčo *docking* zabezpečuje priblíženie váčku k cieľovej membráne na vzdialenosť šírky membránovej dvojvrstvy. Niekedy sa používa výraz *tethering* v širšom zmysle pre oba opísané procesy. Po priblížení vezikulu k definovanej časti CPM (ACD) dochádza k samotnej fúzii membrány vezikulu a CPM sprostredkovanej SNARE proteínmi (V. Žárský *et al.*, 2009).

Dôležitý krok cielenia váčkov odvodených z Golgiho aparátu v procese exocytózy zabezpečuje proteínový *tethering* (u užšom zmysle) komplex nazývaný exocyst (M. Hála *et al.*,

2008). Komplex exocyst bol už dávnejšie charakterizovaný u kvasiniek a živočíchov, kde sa mimo iného podieľa na procesoch polarizovanej exocytózy ako napr. na pučaní kvasinky či raste neuritu. Prítomnosť rastlinných homológov podjednotiek exocystu v bunkách rastlín bola pôvodne predpokladaná na základe porovnávania genómov (Elias *et al.*, 2003). Následne bola prítomnosť exocystu v sporofyte a v peľovom vrecúšku (samčom gametofyte) experimentálne potvrdená (M. Hála *et al.*, 2008).

Exocyst je tvorený ôsmimi podjednotkami označovanými rovnako ako u kvasiniek a živočíchov, t.j. Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 a Exo84. V genóme *Arabidopsis* má skoro každá podjednotka aspoň dve izoformy. Najpočetnejšou je Exo70 izoforma, ktorá má 23 paralógov, čím sa značne líši od svojich ortológov u kvasiniek a živočíchov. Exo70 a Sec3 podjednotky pravdepodobne fungujú na označenie miesta CPM kde neskôr dôjde k *tetheringu*. Podľa jednej z teórií k samotnému zostaveniu exocystu dochádza až v momente keď podjednotky asociované s vezikulom prídu do kontaktu s Exo70 a Sec3 podjednotkami na CPM. To by vysvetľovalo veľké množstvo Exo70 izoformiem, ktoré by sa mohli podieľať na označení a následnej tvorbe špecifických ACD a recyklujúcich domén (V. Žárský *et al.*, 2009). Paralógy Exo70 by mohli byť súčasťou rôznych komplexov exocystu vrámci jednej bunky (V. Žárský *et al.*, 2009), čo by poukazovalo na rôznorodé funkcie v sekrécii, vrátane možnej odpovedi pri útoku patogéna (viď nižšie).

Exo70 podjednotka u *Arabidopsis* a Sec3 podjednotky majú vo svojom polypeptidovom reťazci konzervované väzbové miesta pre fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát, čo by potvrdzovalo ich väzbu na membránu v mieste ACD (X. Zhang *et al.*, 2008; V. Žárský *et al.*, 2009).

GTPázy triedy Rop (*Rho of plants*) sa významnou mierou podieľajú na organizácii sekretorickej dráhy a cytoskeletu u rastlín v procese polarizovanej exocytózy (B. Kost, 2008; S. Yalovsky *et al.*, 2008; V. Žárský *et al.*, 2009). Rop GTPáza interaguje aj so Sec3 podjednotkou exocystu nepriamo prostredníctvom Icr1 proteínu (M. Lavy *et al.*, 2007). Exocyst je zároveň efektorom Rab GTPázy vezikulu (M. Hála *et al.*, 2008).

2.1.1.2 Indukcia Exo70 podjednotiek exocystu patogénmi a elicitorami

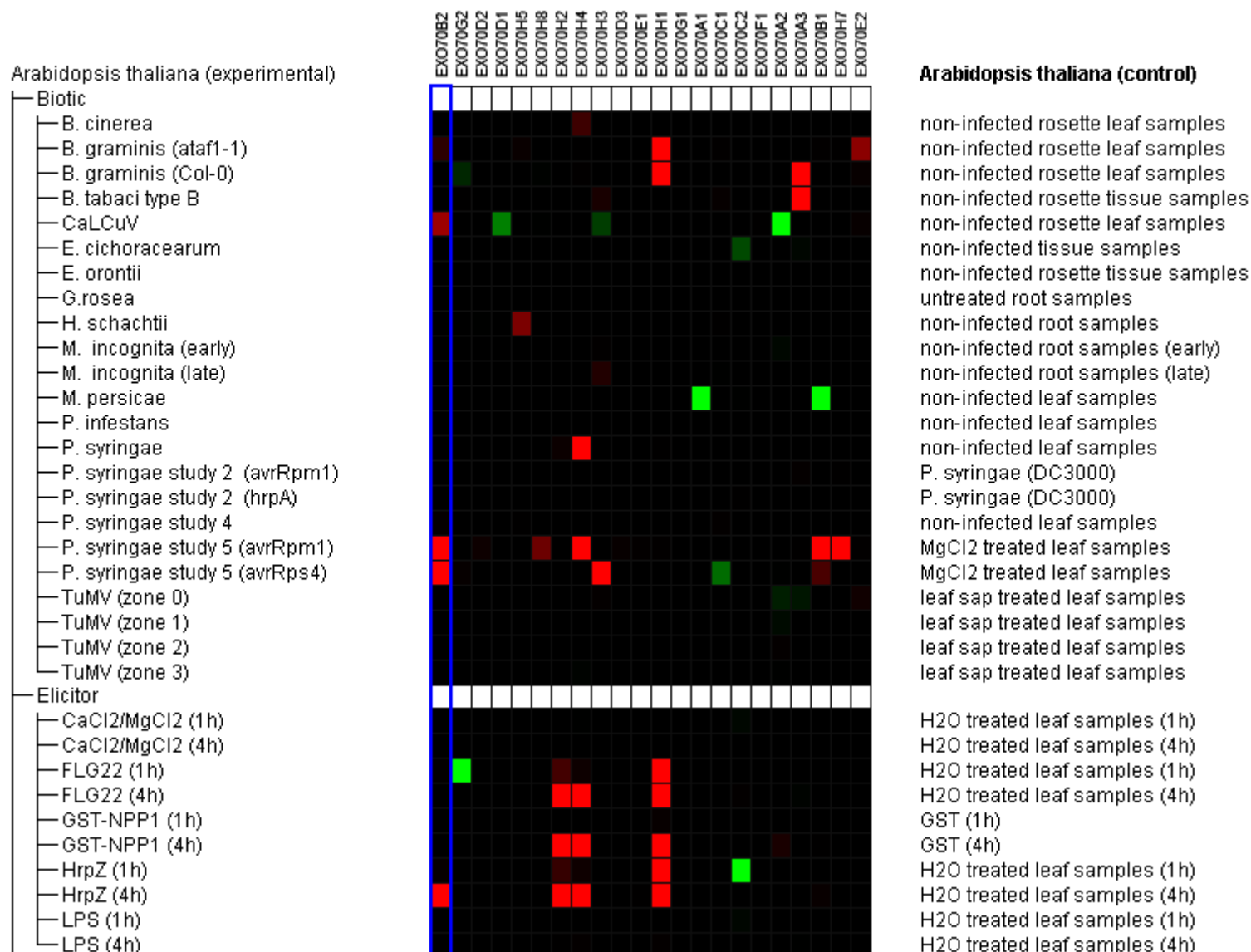
Ako bolo naznačené vyššie, značné množstvo paralógov kódujúcich Exo70 podjednotky exocystu v genóme *Arabidopsis* by sa mohlo podieľať na sekretorickej odpovedi na rôzne abiotické či biotické stresy. Ako naznačujú dostupné microarrayové dáta (viď napr. www.genevestigator.com), mnohé z izoformiem Exo70 podjednotky sú vo zvýšenej miere exprimované v prítomnosti niektorých elicitorov a konkrétnych patogénov (viď Obr. 5). Keďže rastliny sú sesilné organizmy, ktoré nemajú bunky imunitného systému (ako ich poznáme u živočíchov), zvýšený počet Exo70 podjednotiek

exocystu by mohol byť jednou z adaptácií na prisadnutý spôsob života.

Rôzne izoformy pritom vykazujú odlišnú odpoveď na daný druh patogéna/elicitoru rozličnou zmenou úrovne transkripcie (Obr. 5). Exo70B2 podjednotka je zvýšene transkribovaná v prítomnosti bakteriálneho patogéna *Pseudomonas syringae* exprimujúceho Rpm1 resp. Rps4 avirulentné proteíny. Úrovne transkriptu Exo70H1 a Exo70A3 sú naopak zvýšené pri infekcii hubovými patogénmi *Blumeria graminis* resp. *Blumeria tabaci*. Podobne Exo70H1, Exo70H2 a Exo70H4 sú upregulované v prítomnosti niektorých bakteriálnych elicitorov, z ktorých niektoré slúžia ako PAMPs (napr. flagelín).

Aj keď doteraz nie je známa úloha exocystu v obrane proti patogénom, možno na základe veľkého počtu kópií Exo70 podjednotky typického pre rastliny a dostupných dát predpokladať jeho účasť na tomto procese.

-2.5 -2.0 -1.5 -1.0 -0.5 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5



Obrázok 5: Úroveň transkripcie jednotlivých Exo70 podjednotiek zobrazená ako microarrayové dáta vo forme tzv. *heat map*. Červený obdĺžnik znamená zvýšenú úroveň transkripcie v prítomnosti daného elicitoru/patogéna, zelený obdĺžnik značí zníženú mieru transkripcie. Rastliny experimentálne infikované patogénom alebo ošetrované elicitorom (vľavo) sú porovnané s kontrolnými rastlinami (vpravo). (Podľa www.geneinvestigator.com; upravené)

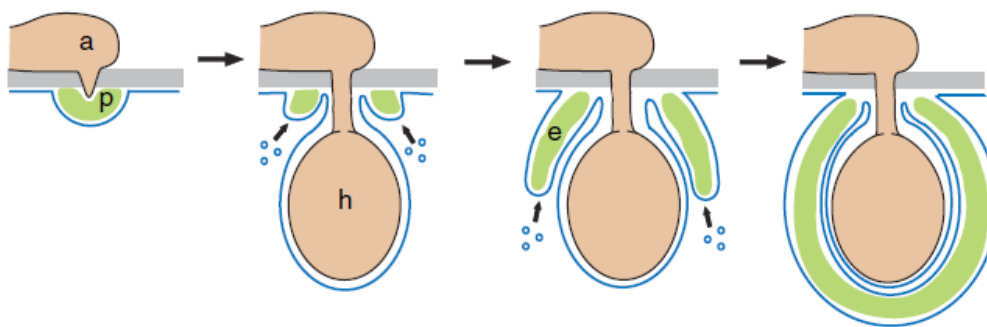
3 Polarizovaná sekrécia a patogén

3.1 Sekrécia ako obrana

V predchádzajúcej kapitole bola opísaná bunková polarizácia ako fenomén podieľajúci sa na tvorbe rastlinného tela. Bunka však odpovedá polarizáciou aj na vonkajšie podnety. Jedným z nich je napadnutie patogénom.

3.1.1 Úloha sekrécie pri tvorbe papily a haustoriálnych obalov pri ataku hubového patogéna

Mnohé patogény prekonávajú konštitutívnu bariéru bunkovej steny. Tvorba papily je jednou z prvých obranných reakcií proti penetrujúcim patogénom. Papila vzniká následkom lokalizovanej sekrécie zložiek bunkovej steny do miesta penetrácie (viď 1.2.1) a predstavuje štruktúrne zosilnenie a cieľnú chemickú obranu proti prenikajúcemu patogénovi. Charakteristickou zlúčeninou papily je kalóza (β -1,3-glukán), obsahuje však aj ďalšie zložky bunkovej steny ako napr. celulózu, lignín, proteíny bohaté na hydroxyprolín, ale aj antimikrobiálne zlúčeniny (napr. thioníny a fenolické látky) (D. Meyer *et al.*, 2009). Typickým príkladom obrannej odpovede založenej na tvorbe papily je obrana proti hubovým patogénom penetrujúcim BS. Tvorba papily však bola pozorovaná aj v mieste kontaktu s patogénnymi druhmi baktérií, ktoré (narozdiel od húb) neprenikajú cez BS (C. Kwon *et al.*, 2008). Väčšina patogénnych druhov húb prichádza do kontaktu s rastlinou na povrchu epidermálnych buniek. Spóra, ktorá vyklíči, vytvára špecializované štruktúry na preniknutie BS nazývané appresória (C. Kwon *et al.*, 2008). Keď sa appresóriu podarí prekonať BS a následne aj papilu, začne sa diferencovať na intracelulárnu hýfu, ktorá pravdepodobne umožňuje výmenu živín a virulentných faktorov medzi protoplastom hostiteľskej bunky a samotným patogénom. Na tvorbu haustória rastlinná bunka reaguje rozšírením papily a vytvorením buď len golierového lemu (anglicky *collar*) okolo kŕčku haustória alebo aj následným rozšírením a spojením tohoto lemu, čím vzniká tzv. haustoriálny obal (anglicky *haustorial encasement*; Obr. 6.) (D. Meyer *et al.*, 2009). Golierový lem a haustoriálny obal vznikajú depozíciou nového materiálu do papily. Zdá sa, že významnú obrannú úlohu v papile zohrávajú komponenty sekretorickej dráhy asociované s exocytózou.



Obrázok 6: Tvorba haustoriálneho obalu okolo vznikajúceho haustória u *Arabidopsis*. Po penetrácii bunkovej steny appresóriom (a) bunka vytvorí obrannú papilu (p), ktorá sa dodávaním materiálu prostredníctvom váčkov rozširuje a v prvom štádiu tvorí golierový lem okolo vznikajúceho haustória (h). Lem sa môže v závislosti na druhu patogéna ďalej rozšíriť a spojiť, čím vzniká haustoriálny obal (e) obklopujúci haustórium. (Podľa D. Meyer et. al., 2009)

3.1.1.1 Reorganizácia cytoskeletu v procese polarizovanej sekrécie pri útoku patogéna

Cytoskelet rastlinnej bunky sa aktívne podieľa na procesoch polarizovanej sekrécie. Pri napadnutí rastlinnej bunky hubovým patogénom dochádza k prestavbe cytoskeletu, ktorá umožní polarizovanú sekréciu do miesta ataku. Aktínové filamenty sa orientujú smerom ku kontaktnému miestu appresória. Aktínové zväzky v transverzálnych cytoplazmatických prúžkoch prechádzajúcich centrálnou vakuolou spájajú jadro s miestom potencionalnej penetrácie a v mnohých prípadoch umožňujú (za pomoci molekulárnych motorov) presun jadra k tomuto miestu. Presun jadra ku miestu penetrácie bol pozorovaný v súvislosti s tvorbou papily v inkompatibilnej interakcii rastliny a patogéna. Podobne dochádza k orientácii mikrotubulov smerom do kontaktného miesta (P. Gross et al., 1993; E. Schmelzer, 2002; A. Hardham et al., 2007).

Reorganizácia cytoskeletu zároveň zabezpečuje pozorované premiestnenie ER a GA do miesta penetrácie. Lokalizácia komponentov sekretorickej dráhy do jedného miesta následne umožňuje polarizovanú exocytózu sekretorických váčkov podieľajúcich sa na tvorbe papily.

Dôležitú úlohu v obrane proti hubovým patogénom zohrávajú SNARE proteíny podieľajúce sa na splývaní sekretorických váčkov s CPM v mieste ataku BS hubovým appresóriom.

3.1.1.2 SNARE proteíny a obrana založená na papile

Pri štúdiu interakcie plesne *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, ktorá normálne parazituje na jačmeni (*Hordeum*) a rastlinou *Arabidopsis* bol vykonaný screen na mutantov *Arabidopsis*, ktorí vykazovali zvýšenú frekvenciu penetrácie touto plesňou. Mutanty získané v tomto screene boli označené ako *pen1*, *pen2* a *pen3* (*pen* = *penetration*) (W. Underwood, S. C. Somerville, 2008).

Ďalšia analýza ukázala, že *PEN1* (*SYPI21*) kóduje jeden zo syntaxínov (t-SNARE) cytoplazmatickej membrány podieľajúci sa na fúzii vaku s CPM pri exocytóze (W. Underwood, S. C. Somerville, 2008). *PEN1* syntaxín interaguje so SNAP33 proteínom (SNAP = *synaptosomal-associated protein*; molekulová hmotnosť 33 kDa) v CPM a VAMP 721/722 proteínmi vezikulu (VAMP = *vesicle-associated membrane protein*) a vytvára s nimi ternárny SNARE komplex (C. Kwon, P. Bednarek, P. Schulze-Lefert, 2008). Je pozoruhodné, že tento komplex je lokalizovaný v miestach, kde dochádza k pokusom o penetráciu bunkovej steny niektorými hubovými patogénmi (D. Meyer *et al.*, 2009).

Pri pokusoch s expresiou GFP-*PEN1* boli semenáčky *Arabidopsis* inokulované spórmi rôznych druhov penetrujúcich hubových patogénov z oddelenia *Ascomycetes*. Boli medzi nimi patogény, pre ktorých je *Arabidopsis* hostiteľským organizmom (napr. *Golovinomyces cichoracearum*; syn. *Erysiphe cichoracearum*), ale aj patogény normálne parazitujúce na inej hostiteľskej rastline (napr. *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*; ďalej len *Bgh*) (D. Meyer *et al.*, 2009). *Bgh* na *Arabidopsis* je príkladom neadaptovaného patogéna, t.j. takého patogéna, ktorý nedokáže spôsobiť ochorenie na žiadnom z vybraných rastlinných druhov a bariéru bunkovej steny epidermálnych buniek nehostiteľskej rastliny prekonáva len výnimočne a to s oveľa nižšou frekvenciou v porovnaní s adaptovanými patogénmi (W. Underwood, S. C. Somerville, 2008). Ukázalo sa, že v prípade *PEN1* dochádza k akumulácii pod miestom penetrácie adaptovaných aj neadaptovaných patogénnych húb s porovnateľnou frekvenciou. Signál GFP-*PEN1* bol však pozorovaný len pod appresóriami patogénov zo skupiny v anglickej literatúre označovanej ako *powdery mildew*, ale nie u iných sledovaných húb skupiny *Ascomycetes* (D. Meyer *et al.*, 2009). *Powdery Mildews* sú hubové patogény z radu *Erysiphales*.

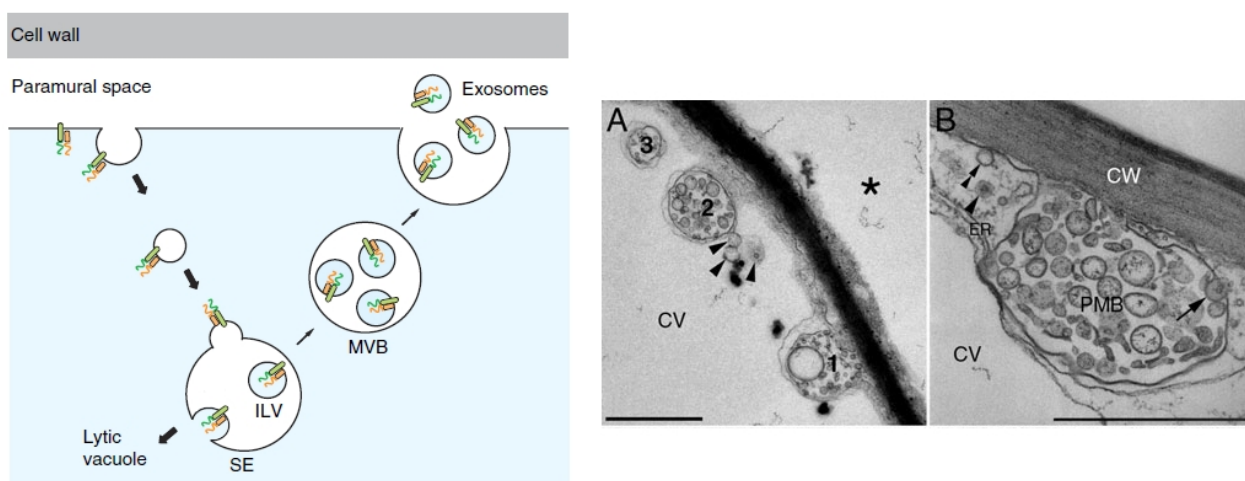
Aj keď *PEN1* a SNAP33 sú rezidentnými proteínmi CPM, pri pokusoch interakcie *Arabidopsis* a *Bgh* bola na základe fluorescencie emitovanej fúznymi konštruktami týchto proteínov s GFP resp. mYFP pozorovaná ich lokalizácia v papile, teda v paramurálnom priestore mimo CPM. Lokalizácia *PEN1* bola na základe porovnania fluorescencie s kalózou potvrdená aj v haustoriálnych obaloch obklopujúcich appresoriá *Bgh*, *Golovinomyces orontii*, *Erysiphe pisi* a *Hyaloperonospora parasitica*. V haustoriálnych obaloch bol potvrdený výskyt aj VAMP722 proteínu, ale s oveľa nižšou frekvenciou v porovnaní s *PEN1* a SNAP33 (D. Meyer *et al.*, 2009).

Pri predchádzajúcich pokusoch interakcie *Bgh* a jačmeňa (*Hordeum vulgare*; pre *Bgh* hostiteľská rastlina) rezistentného na penetráciu touto plesňou boli pozorované rôzne vezikulom podobné telieska asociované s papilou. Pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM) boli v blízkosti nepenetrovanej papily pozorované multivezikulárne telieska (MVB), malé telieska do veľkosti 0,5 µm a tzv. paramurálne telieska (*paramural bodies*; PMB). Ako PMB označili autori

kompartmenty asociované s BS, ktorých membrána tvorí kontinuum s CPM a ktoré podobne ako MVB obsahujú vezikuly vo svojom vnútri. Autori ďalej špekulovali, že PMB sú vlastne MVB, ktoré fúzovali s CPM a teda dochádza k spĺývaniu MVB s CPM a uvoľneniu intraluminálnych vezikulov do papily (Qianli A. *et al.*, 2006).

V interiore papily bola detekovaná aj fluorescencia lipofilného markera membrán FM4-64, čo naznačuje, že papila obsahuje membránový materiál. Zároveň bola v papile pozorovaná pretrvávajúca fluorescencia GFP nezvyčajne dlho (rádovo dni), aj keď GFP obvykle vykazuje pri nízkom pH BS minimálnu fluorescenciu (D. Meyer *et al.*, 2009).

Tieto zistenia spolu s pozorovaním lokalizácie a predpokladanej fúzie MVB s CPM viedli autorov D. Meyer *et al.* k vytvoreniu modelu transportu váčkov obsahujúcich vo svojej membráne PEN1 a SNAP33 proteíny do papily (Obr. 7). Tento model predpokladá, že PEN1 a SNAP33 syntaxíny sú prostredníctvom endocytózy internalizované a vezikuly obsahujúce tieto proteíny v membráne následne spĺývajú s endozómom označovaným ako *sorting endosome*. Invagináciou membrány *sorting* endozómu smerom dovnútra vznikajú tzv. intraluminálne váčky, ktorých vnútro má približne rovnaké chemické zloženie ako cytoplazma. Vznikajú tak MVB, ktoré vo všeobecnosti môžu spĺvať s vakuolou a ich obsah je degradovaný, alebo, ako sa predpokladá v prípade uvedených SNARE proteínov, spĺývajú s cytoplazmatickou membránou (exocytóza), pričom do apoplastu uvoľňujú intraluminálne vezikuly označované ako exozómy (D. Meyer *et al.*, 2009).



Obrázok 7: Transport SNARE proteínov do paramurálneho priestoru. *Vpravo:* A - snímka z TEM zobrazujúca paramurálne telieska (1), multivezikulárne telieska (2), intravakuolárne multivezikulárne telieska (3) a jednoduché vezikuly v centrálnej vakuole (hroty šípok) v blízkosti bunkového povrchu epidermálnych buniek jačmeňa (hviezdička označuje susednú bunku napadnutú patogénom); B - detail paramurálneho telieska (PMB) asociovaného s bunkovou stenou (CW). Šípka zobrazuje pučanie vezikulu na membráne PMB smerom von. Hrot šípky (vľavo hore) ukazuje na elektródenzný vezikul, dvojhrot šípky poukazuje na potencionálny sekretorický váčok. *Vľavo:* model tvorby a uvoľňovania exozómov. Na obrázku sú zobrazené PEN1 (zelený) a SNAP33 (žltý) proteíny s ich fluorescenčnými značkami (cikcaky). Pre ďalšie podrobnosti pozrite text. (Obrázok vpravo podľa Qianli A. *et al.*, 2006; obrázok vľavo podľa D. Meyer *et al.*, 2009.)

Prečo dochádza k akumulácii PEN1 proteínu len v odpovedi na *powdery mildews*? Podľa autorov D. Meyer *et al.* môže byť táto špecifická odpoveď následkom rôznych stratégií penetrujúcich patogénnych húb, ale je aj možné, že len *powdery mildews* nedokážu potlačiť akumuláciu PEN1 v papile. Akumulácia GFP-PEN1 v papile však bola pozorovaná po indukcii adaptovanými aj neadaptovanými *powdery mildews* s porovnateľnou frekvenciou, aj keď len adaptované patogény dokázali vniknúť do epidermálnych buniek (viď vyššie). Naznačuje to, že adaptované *powdery mildews* nepotlačujú extracelulárnu akumuláciu PEN1, ale sú pravdepodobne schopné detoxifikovať pre nich nebezpečný náklad sekretovaný vo vezikuloch, prípadne blokovať tvorbu PEN1 ternárnych SNARE komplexov (D. Meyer *et al.*, 2009).

Je dôležité poznamenať, že zatiaľčo akumulácia PEN1 v papile je odpoveďou rastliny len na *powdery mildews*, akumulácia GFP-PEN1 bola v haustoriálnych obaloch pozorovaná aj pri obrane proti iným skupinám hubových patogénov (viď vyššie).

Najbližším homológom PEN1 (SYP121) proteínu je SYP122 syntaxín. Experimenty s infekciou *Arabidopsis* plesňami *Bgh* (nehostiteľský patogén) a *E. cichoracearum* (hostiteľský patogén) ukázali, že SYP122 je podobne ako PEN1 up-regulovaný pri infekcii týmito patogénmi, a to dokonca oveľa výraznejšie v porovnaní s PEN1. Avšak pri porovnaní úspešnosti penetrácie BS patogénom *Bgh* u *pen1*, resp. *syp122-1* mutantov nebola pozorovaná zvýšená frekvencia penetrácie v prípade *syp122-1* mutantov, zatiaľčo v prípade *pen1* mutantov bola frekvencia penetrácie BS výrazne zvýšená. Dvojití mutanti *pen1 syp122-1* boli trpasličieho vzrastu a mali nekrotické škvrny na listoch. Neboli však pritom porušené vývinové procesy vyžadujúce polarizovanú sekréciu ako napr. rast koreňových vláskov alebo tvorba trichómov. Fenotyp dvojitých mutantov naznačuje, že PEN1 a SYP122 syntaxíny zohrávajú úlohu nielen pri útoku patogéna, ale aj pri sekrécii počas ontogenetických procesov a ich úlohy sa čiastočne prekrývajú. Pre PEN1 proteín (ako bolo ukázané vyššie) je zároveň typická ohnisková akumulácia pod miestom penetrácie BS pri ataku niektorých patogénov. Mutantná *pen1* rastlina vykazuje oneskorenú tvorbu papily pri infekcii *Bgh*, čo spôsobuje jej náchylnosť k tomuto patogénovi (F. F. Assaad *et al.*, 2004).

Zdá sa, že zatiaľčo SYP122 syntaxín zohráva úlohu v difúznej sekrécii, PEN1 sa podieľa na polarizovanej sekrécii pri tvorbe papily v odpovedi na útok hubového patogéna (F. F. Assaad *et al.*, 2004).

3.1.2 Sekrécia v obrane proti bakteriálnym patogénom

Bakteriálne patogény rastlín zostávajú na rozdiel od hubových patogénnych mikroorganizmov vonku mimo hostiteľskej bunky. Rastlina sa preto musí vysporiadať s extracelulárnou infekciou (M. Kalde *et. al.*, 2007).

3.1.2.1 SYP132 syntaxín a obrana proti *Pseudomonas syringae*

Ako bolo ukázané v prípade Arabidopsis, syntaxíny zohrávajú dôležitú úlohu v obrane proti hubovým patogénom. Polarizovaná sekrécia však má významnú úlohu aj v obrane proti extracelulárnym patogénnym baktériám. Pri obrane proti baktérii *Pseudomonas syringae* plní v rastline tabaku (*Nicotiana benthamiana*) dôležitú funkciu syntaxín SYP132.

NbSYP132 u *N. benthamiana* bol vybraný ako pravdepodobný kandidát t-SNARE proteínu zúčastňujúceho sa obrany proti baktérii na základe fosfoproteomického screenu vykonaného u Arabidopsis, v ktorom bol identifikovaný AtSYP132 (At5g08080) syntaxín. NbSYP132 u *N. benthamiana* (ďalej len „tabak“) je ortológom AtSYP132 u Arabidopsis (M. Kalde *et. al.*, 2007).

Na preskúmanie funkcie tohto SNARE proteínu boli rastliny tabaku infikované baktériou *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (ďalej len *Pstab*) exprimujúcou avirulentný AvrPto proteín z iného patovaru (zástupcu daného druhu, ktorý sa líši svojou patogenitou a hostiteľským organizmom) tohoto druhu baktérie parazitujúcej na paradajke (baktéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). AvrPto proteín je bakteriálny efektor injikovaný do hostiteľskej bunky pomocou sekrečného systému typu III, kde môže byť následne nepriamo rozpoznaný prostredníctvom Pto R proteínu rastliny. Takáto interakcia obvykle spustí ETI obrannú odpoveď (viď oddiel 1.2.2).

WT (*wild type*) rastlina exprimujúca Pto R proteín by teda mala byť teoreticky rezistentná voči *Pstab*. Pokusy s tabakom tvoriacim tento R proteín to potvrdzujú. Naproti tomu je rastlina tabaku, v ktorej je SYP132 umlčaný, citlivá na infekciu *Pstab* exprimujúcim AvrPto v kompatibilnej aj inkompatibilnej interakcii takmer rovnako (M. Kalde *et. al.*, 2007).

Tieto výsledky naznačovali, že SYP132 proteín by mohol byť komponent ETI obrannej odpovede podľa *gene-for-gene hypothesis*. Ako však bolo neskôr ukázané (v pokusoch s *Agrobacterium tumefaciens* exprimujúcim AvrPto a s flagelínom), umlčanie SYP132 proteínu neeliminuje hypersenzitívnu reakciu často pozorovanú v ETI odpovedi ani produkciu ROS v reakcii na PAMPs (bazálna obrana). Predsa však rastliny s umlčanou expresiou tohto proteínu sú citlivejšie na *P. syringae* ako WT (M. Kalde *et. al.*, 2007).

Odpoveďou na otázku biologickej funkcie SYP132 proteínu bolo porovnanie apoplastických proteínov po infekcii *Pstab* u WT a SYP132-umlčaných rastlín. Na základe homológie s AtSYP132, syntaxínom CPM u Arabidopsis sa totiž predpokladala podobná funkcia aj v tabaku. Skutočne sa

potvrdila znížená koncentrácia PR1a proteínu v apoplaste. PR1 je jedným z *pathogenesis related* proteínov sekretovaných v obrannej reakcii (viď oddiel 1.1.1). Zdá sa preto, že SYP132 funguje ako t-SNARE proteín CPM umožňujúci fúziu váčkov s PR1a proteínom s CPM (M. Kalde *et. al.*, 2007).

PR1a proteín bol v apoplaste napriek tomu v malých množstvách detekovaný a pri ďalšom skúmaní apoplastických proteínov sa zistilo, že pri infekcii SYP132-umlčaného tabaku avirulentným *Pstab* (s AvrPto) dochádza k 1-dňovému oneskoreniu akumulácie PR1a proteínu v apoplaste. Akumulácia transkriptu PR1a v bunkách naopak zostala ako u WT (bez oneskorenia). Ako tvrdia autori, samotná akumulácia PR1a proteínu v transgénnom tabaku môže byť spôsobená nedostatočným umlčaním *SYP132* génu v priebehu experimentu (M. Kalde *et. al.*, 2007), ale aj možnou redundanciou ďalších SNARE. Predsa však môžeme na tomto príklade dobre vidieť význam časovania sekrécie v obrane proti patogénom. Zatiaľčo jednoduché oneskorenie akumulácie PR1a proteínu v apoplaste spôsobí stratu rezistencie voči *Pstab* u tabaku, mutantná *pen1* Arabidopsis vykazuje oneskorenú tvorbu papily a tým zníženú odolnosť voči *Bgh powdery mildew*.

Samotný SYP132 syntaxín pritom pravdepodobne sprostredkúva fúziu vezikulov nesúcich rôzne antimikrobiálne zlúčeniny a umlčanie génu pre tento syntaxín spôsobuje zastavenie ich sekrécie a pozorovaný prejav straty rezistencie (M. Kalde *et. al.*, 2007).

Medzi SYP132 syntaxínom tabaku a PEN1 (SYP121) syntaxínom Arabidopsis možno pozorovať ešte aspoň jednu spoločnú črtu. Podobne ako PEN1, aj SYP132 sa totiž pravdepodobne zúčastňuje sekrécie počas ontogenézy. Naznačuje to fenotyp 12 týždňov starého SYP132-umlčaného tabaku, ktorý má oproti WT rastline kratšie stonky a listové stopky, širšie listy a vykazuje čiastočnú stratu apikálnej dominancie (M. Kalde *et. al.*, 2007).

3.1.2.2 Fúzia vakuoly s CPM sprostredkovaná proteazómom

Aj keď t-SNARE plnia nezastupiteľnú úlohu v obrane, syntaxínmi sprostredkovaná fúzia váčkov s PR obrannými proteínmi nie je jediným mechanizmom podieľajúcim sa na sekretorickej obrane rastlinnej bunky proti bakteriálnym patogénom. Po infekcii baktériou bola pozorovaná aj zvýšená expresia vakuolárnych obranných proteínov (pre review pozrite L. C. van Loon *et al.*, 2006).

Ako sú vakuolárne obranné proteíny sekretované von do medzibunkového priestoru, kde obvykle dochádza k bakteriálnej infekcii?

Odpoveď na túto otázku priniesli japonskí výskumníci pri podrobnom pozorovaní interakcie rastliny Arabidopsis tvoriacej RPM1 R proteín a baktérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 exprimujúcej AvrRpm1 efektor. Po inokulácii Arabidopsis touto baktériou bola v inak intaktných bunkách pomocou TEM pozorovaná fúzia vakuolárnej a cytoplazmatickej membrány.

Fúzia bola následne potvrdená aj na základe pozorovania kolokalizácie fluorescenčných markerov CPM, resp. tonoplastu v transgénnych *Arabidopsis* po infekcii *Pst* DC3000/*avrRpm1*. V odpovedi na infekciu týmto patogénom baktérie teda dochádza k fúzii veľkej centrálnej vakuoly s CPM a následnému uvoľneniu antibakteriálnych proteínov do apoplastu (N. Hatsugai *et al.*, 2009). Lokalizácia vakuolárnych proteínov v apoplaste bola predpokladaná na základe pozorovania lokalizácie vakuolárneho fluorescenčne značeného proteínu. Extracelulárna tekutina z infikovaných listov navyše výrazne inhibovala rast *Pst* DC3000/*avrRpm1* a indukovala bunkovú smrť v bunkách neinfikovaných listov (N. Hatsugai *et al.*, 2009).

Hypersenzitívna reakcia pozorovaná po aplikácii extracelulárnej tekutiny bola pripisovaná činnosti proteázy s aktivitou kaspázy 3. Po pridaní inhibítorov kaspázy 3 a niekoľkých inhibítorov proteazómu došlo skutočne k eliminácii HR. Pri experimentoch s RNAi líniami *Arabidopsis* s potlačeným *PBA1* génom pre $\beta 1$ podjednotku proteazómu bola následne potvrdená aktivita kaspázy 3 u PBA1 podjednotky. RNAi transformanti v tejto podjednotke zároveň vykazovali zníženú frekvenciu HR po infekcii avirulentným (*Pst* DC3000/*avrRpm1*), ale už nie virulentným kmeňom (bez Avr proteínu). Tieto výsledky naznačujú, že proteazóm sa zúčastňuje HR v ETI odpovedi sprostredkovanej RPM1 R receptorm (N. Hatsugai *et al.*, 2009).

Otázkou ešte ostávalo, aký mechanizmus zabezpečuje fúziu vakuoly s CPM. Po pridaní inhibítorov kaspázy 3 a inhibítorov PBA1 podjednotky proteazómu došlo nielen k eliminácii HR, ale aj fúzie vakuoly s CPM a uvoľneniu vakuolárnych proteínov do apoplastu. Absencia fúzie vakuolárnej a CPM bola pozorovaná aj pri infekcii RNAi transformantov v PBA1 podjednotke avirulentným kmeňom baktérie. Baktériou indukovaná fúzia vakuoly s CPM je teda regulovaná proteazómom (N. Hatsugai *et al.*, 2009).

Samotný mechanizmus by podľa autorov mohol spočívať v proteazómom sprostredkovanej degradácii negatívneho regulátora fúzie v odpovedi na bakteriálnu infekciu. Táto odpoveď pritom nie je zdá sa obmedzená len na konkrétny patogén baktérie, ale uplatňuje sa pravdepodobne širšie pri rozpoznaní bakteriálnych efektorov, ako to naznačuje pozorovaný prípad fúzie po infekcii patogénom exprimujúcim AvrRpt2 efektor (N. Hatsugai *et al.*, 2009).

4 Záver

Cieľom práce bolo predovšetkým poukázať na súčasný pohľad na problematiku zapojenia sekretorickej dráhy v obrane proti patogénom, ale aj zhrnúť niektoré staršie poznatky súvisiace s touto témou.

Tvorba papily za účasti komponentov sekretorickej dráhy predstavuje u rastlín pomerne dobre definovanú obrannú stratégiu uplatňujúcu sa v obrane proti hubovým aj bakteriálnym patogénom. Papila vzniká syntézou kalózy na cytoplazmatickej membráne, ale aj sekréciou fenolických látok a antimikrobiálnych zlúčenín do priestoru bunkovej steny. Po penetrácii bunkovej steny sa papila môže rozšíriť do golierového lemu až haustoriálneho obalu obklopujúceho vznikajúce haustórium.

Značná časť výskumu sa v súčasnosti zameriava na úlohu SNARE proteínov v sekretorickej obrane proti hubovým aj bakteriálnym patogénom. Doterajšie výsledky naznačujú, že SNARE proteíny plnia skutočne nezastupiteľnú úlohu v polarizovanej sekrécii v procesoch tvorby obrannej papily a sekrécii antimikrobiálnych proteínov.

Pri popise interakcie s hubovými patogénmi bol dôraz partikulárne kladený na PEN1 a SNAP33 proteíny cytoplazmatickej membrány *Arabidopsis*. Opísaná bola ich lokalizácia pri infekcii rôznymi hubovými patogénmi, možná úloha v polarizovanej sekrécii v porovnaní s inými SNARE proteínmi (SYP122) a v neposlednom rade aj pomerne nedávno publikovaný mechanizmus ich lokalizácie v interiore papily.

Pri infekcii bakteriálnym patogénom sa podobne uplatňuje SYP132 syntaxín cytoplazmatickej membrány rastliny tabaku. Jeho význam spočíva pravdepodobne v sprostredkovaní fúzie váčkov nesúcich antimikrobiálne zlúčeniny s cytoplazmatickou membránou.

Zdôraznený bol význam časovania sekrécie pri tvorbe papily a sekrécie antimikrobiálnych proteínov na príklade mutantných *pen1* a SYP132-umlčaných rastlín. PEN1 a SYP132 sa taktiež zúčastňujú v procesoch polarizovanej sekrécie v priebehu ontogenézy.

Novo popísanou obrannou stratégiou proti bakteriálnym patogénom je fúzia veľkej centrálnej vakuoly s cytoplazmatickou membránou za súčasného uvoľnenia antibakteriálnych proteínov do apoplastu. Zaujímavá je tiež účasť proteazómu na tomto procese.

Pokrok vo výskume v tomto smere bol umožnený rozvojom techník fluorescenčného značenia proteínov a membrán, využitím RNA interferencie pri skúmaní biologickej funkcie proteínov, ale aj transmisnej elektrónovej mikroskopie, ktorá pomohla odhaliť mnohé ultraštruktúrne črty interakcie patogéna s hostiteľskou bunkou. Príklady využitia jednotlivých techník sú v texte pri konkrétnych prípadoch uvedené.

Úloha komplexu exocyst narozdiel od SNARE proteínov nie je v procese polarizovanej sekrécie pri útoku patogéna na rastlinnú bunku prakticky známa. Dáta však naznačujú, že niektoré izoformy Exo70 podjednotky by sa mohli podieľať na odpovedi na hubovú či bakteriálnu infekciu. V súčasnosti sa začína zameriavať základný výskum aj na túto oblasť.

Aj keď veľký rozvoj mikroskopických a molekulárno-biologických techník umožnil objaviť nové komponenty sekretorickej dráhy zúčastňujúce sa obrany, pre pochopenie hlbších súvislostí bude potrebný ďalší výskum týkajúci sa nielen samotnej polarizovanej sekrécie, ale aj cytoskeletu a proteínov regulujúcich tento proces.

5 Zoznam použitej literatúry

- Assaad, F. F., Qiu, J., Youngs, H., Ehrhardt, D., Zimmerli, L., Kalde, M., Wanner, G., Peck, S. C., Edwards, H., Ramonell, K., Somerville, Ch. R., Thordal-Christensen, H. (2004) The PEN1 Syntaxin Defines a Novel Cellular Compartment upon Fungal Attack and Is Required for the Timely Assembly of Papillae. *Molecular Biology of the Cell* 15, 5118-5129.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J. L. (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 391-399.
- Berken A., Thomas, C., Wittinghofer, A. (2005) A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* 436, 1176-1180.
- D' Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S., Bellincampi, D. (2004) Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696, 237-244.
- Elias, M., Drdova, E., Ziak., D., Bavluka, B., Hala, M., Cvrckova, F., Soukopova, H., Zarsky, V. (2003) The exocyst complex in plants. *Cell Biology International* 27, 199-201.
- Gross, P., Julius, Ch., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. (1993) Translocation of cytoplasm and nucleus to fungal penetration sites is associated with depolymerization of microtubules and defence gene activation in infected, cultured parsley cells. *The EMBO Journal* 12, 1735-1744.
- Hála, M., Cole, R., Synek, L., Drdová, E., Pečenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J. E., Žárský, V. (2008) An Exocyst Complex Functions in Plant Cell Growth in *Arabidopsis* and Tobacco. *The Plant Cell* 20, 1330-1345.
- Hardham, A. R., Jones, D. A., Takemoto, D. (2007) Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 342-348.
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K. (2009) A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes & Development* 23, 2496-2506.
- Hou, S., Yang, Y., Zhou, Jian-Min. (2009) The multilevel and dynamic interplay between plant and pathogen. *Plant Signaling & Behavior* 4, 283-293.
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W. and P. Zimmermann (2008) Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* 2008, 420747
- Kalde, M., Nühse, T. S., Findlay, K., Peck, S. C. (2007) The syntaxin SYP132 contributes to plant resistance against bacteria and secretion of pathogenesis-related protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 11850-11855.
- Kim H., Desveaux, D., Singer, A. U., Patel, P., Sondek, J., Dangl, J. L. (2005) The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 cleaves its C-terminaly acylated target, RIN4, from Arabidopsis membrane to block RPM1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 6496-6501.
- Kim, M. G., da Cunha, L., McFall, A. J., Belkahadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J. L., Mackey, D. (2005) Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in Arabidopsis. *Cell* 121, 749-759.
- Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolia, K., Carpenter, C., Chua, Nam-Hai. (1999) Rac Homologues and Compartmentalized Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Act in a Common Pathway to Regulate Polar Pollen Tube Growth. *The Journal of Cell Biology* 145, 317-330.

- Kost, B.** (2008) Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells. *Trends in Cell Biology* 18, 119-127.
- Kwon, C., Bednarek, P., Schulze-Lefert, P.** (2008) Secretory Pathways in Plant Immune Responses. *Plant Physiology* 147, 1575-1583.
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H., Yalovsky, S.** (2007) A Novel ROP/RAC Effector Links Cell Polarity, Root-Meristem Maintenance, and Vesicle Trafficking. *Current Biology* 17, 947-952.
- Mackey, D., Holt III, B. F., Wiig, A., Dangl, J. L.** (2002) RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 743-754.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Dangl, J. L.** (2003) *Arabidopsis* RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell* 112, 379-389.
- Meyer, D., Pajonk, S., Micali, C., O'Connell, R., Schulze-Lefert, P.** (2009) Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. *The Plant Journal* 57, 986-999.
- Mysore, K. S., Ryu, Choong-Min.** (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* 9, 97-104.
- Naoumkina, M., Farag, M. A., Sumner, L. W., Tang, Y., Liu, Chang-Jun, Dixon, R. A.** (2007) Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 17909-17915
- Nürnbergger, T., Lipka, V.** (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6, 335-345.
- Odjakova, M. and Hadjiivanova, Ch.** (2001) The Complexity of Pathogen Defense in Plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 27(1-2), 101-109.
- Qianli, A., Hükelhoven, R., Kogel, K., van Bel, A. J. E.** (2006) Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cellular Microbiology* 8, 1009-1019.
- Schmelzer, E.** (2002) Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends in Plant Science* 7, 411-415.
- Underwood, W., Somerville, S. C.** (2008) Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. *Journal of Experimental Botany* 59, 3501-3508.
- van der Hoorn, R. A. L., Kamoun, S.** (2008) From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell* 20, 2009-2017.
- van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J.** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135-162
- Whalen, M. C.** (2005) Host defence in a developmental context. *Molecular Plant Pathology* 6, 347-360.
- Yalovsky, S., Bloch, D., Sorek, N., Kost, B.** (2008) Regulation of Membrane Trafficking, Cytoskeleton Dynamics, and Cell Polarity by ROP/RAC GTPases. *Plant Physiology* 147, 1527-1543.
- Yang, Z.** (2008) Cell Polarity Signaling in *Arabidopsis*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24, 551-575.

Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A., Guo, W. (2008) Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *The Journal of Cell Biology* 180, 145-158.

Žárský, V., Cvrčková, F., Potocký, M., Hála, M. (2009) Exocytosis and cell polarity in plants-exocyst and recycling domains. *New Phytologist* 183, 255-272.